

УДК 576.893.161.22 : 577.1.

ИЗУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ЖИРА В ПРИСУТСТВИИ *LAMBLIA DUODENALIS* (IN VITRO)

Р. Ф. Акимова, И. И. Бенедиктов, М. М. Соловьев

Институт медицинской паразитологии и тропической медицины
имени Е. И. Марциновского Министерства здравоохранения СССР, Москва

Изучено влияние *L. duodenalis* из культуры на гидролиз трибутирина липазой. Двумя методами (колориметрическим и потенциометрическим) показано, что в присутствии лямблей скорость гидролиза замедляется. Степень торможения прямо зависит от количества паразитов.

Своеобразие представителей рода *Lamblia* заключается в том, что в отличие от большинства паразитических простейших кишечника они обитают не в толстой, а в тонкой кишки, где идут интенсивные процессы гидролиза пищевых веществ и всасывание продуктов гидролиза. Некоторые особенности строения лямблей указывают на то, что они приспособлены к обитанию на специфической для тонкого кишечника структуре — щеточной кайме кишечного эпителия и их жизнедеятельность тесно связана с процессами, проходящими в ней (Соловьев, 1968; Mueller a. oth., 1973).

Исследования по взаимодействию лямблей с пищеварительными ферментами *in vitro* не проводились, хотя они представляют несомненный интерес как с точки зрения оценки взаимоотношений их с организмом хозяина, так и изучения физиологии этих простейших. В нашей предыдущей работе (Акимова с соавт., 1974) сообщалось, что лямблии не влияли на гидролиз крахмала амилазой. Настоящая работа является продолжением этих исследований и посвящена изучению взаимодействия лямблей с процессами расщепления жира липазой.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Опыты проводились на моноксенической культуре *L. duodenalis*, растущей совместно с пекарскими дрожжами на модифицированной среде Карапетяна — КМ (Соловьев с соавт., 1970). Штамм был выделен в мае 1973 г.

Изучение влияния интактных лямблей на ферментативный гидролиз жиров проводилось двумя методами. По методике А. М. Уголова и М. Ю. Черняховской (1969) изучались заключительные стадии гидролиза. При этом оценивалось количество образовавшегося глицерина за 15 мин в инкубационной смеси, содержащей и не содержащей лямблей.

В качестве субстрата (жира) использовали 0.04%-й раствор трибутирина ($C_{15}H_{26}O_6$), а в качестве ферmenta 0.1%-й раствор липазы (фирмы «Flatters» и «Cornett», Англия). Растворы готовили непосредственно перед опытом. Раствор липазы фильтровали через бумажный фильтр.

Для опыта выбирали флакон с хорошим ростом — 400—500 трофозоитов на стенке флакона в поле зрения микроскопа со слабым увеличением (7×8). Легким покачиванием флакона в горизонтальной плоскости смы-

вали дрожжи со стенки, полностью удаляли среду из флакона и двукратно промывали внутреннюю поверхность теплым (37°) раствором Рингера. Такая промывка обеспечивала удаление остатков среды и дрожжей из флаконов, тогда как лямблии оставались прикрепившимися к стеклу. В отмытые флаконы вносили 3 мл раствора трибутирина и 2 мл липазы. Зависимость интенсивности гидролиза от количества лямблей изучали в специальных опытах. Во флаконы с культурой после промывки вносили по 3 мл холодного раствора Рингера, и флаконы энергично встряхивали для удаления лямблей со стенок. Взвесь лямблей в растворе Рингера переносили в стерильные пробирки, тщательно перемешивали и от 2 до 6 мл переносили в чистые инсулиновые флаконы, получая таким образом в них разное количество лямблей. Флаконы помещали в термостат (37°) на 30 мин для прикрепления лямблей к стенкам. Затем из каждого флакона удаляли раствор Рингера и вносили инкубационную смесь.

В контроле смесь, содержащую 3 мл трибутирина и 2 мл липазы, вносили в чистые флаконы без лямблей. Контрольные и опытные флаконы инкубировали 15 мин в термостате (37°) в аппарате для вращающихся пробирок. Лямблии в течение этого времени оставались жизнеспособными. Для определения количества образовавшегося глицерина использовали реакцию окисления его с иодной кислотой, при которой образуется формальдегид. При добавлении хромотроповой кислоты формальдегид в присутствии $24N$ серной кислоты образует соединения фиолетового цвета.

В химические пробирки, соответствующие числу инкубируемых флаконов, наливали по 2 мл инкубата, 0.1 мл $10N$ H_2SO_4 и добавляли 0.5 мл 0.1 М раствора HJO_4 . Точно через 5 мин после добавления иодной кислоты в каждую пробу приливали 0.5 мл 10%-го раствора метабисульфита Na , перемешивали, после чего в пробах появлялось слегка желтоватое окрашивание. 1 мл пробы переносили в другую пробирку и добавляли 5 мл раствора хромотроповой кислоты следующего состава: 1 г кислоты разводили в 100 мл воды и смешивали с 450 мл $24N$ H_2SO_4 . Пробы перемешивали и ставили на 30 мин в кипящую водяную баню. После охлаждения до комнатной температуры проводили колориметрию проб на фотоэлектроколориметре ФЭК-М с зеленым светофильтром.

В качестве стандарта использовали 0.001%-й раствор глицерина, приготовленный на растворе Рингера, из которого для каждой серии опытов готовили ряд разведений, содержавших от 5 до 50 мкг глицерина в 1 мл и строили калибровочную кривую. Затем рассчитывали среднюю концентрацию (K_{op}) данного ряда стандартов. Значения K вычисляли по формуле $K = \text{мкг глицерина} / \text{экстинкция пробы}$. Количество глицерина в каждой пробе определяли по формуле: экстинкция пробы = $K_{op} \cdot \text{экстинкция пробы}$.

Вторая серия опытов преследовала цель установление кинетики данной ферментативной реакции в присутствии лямблей и без них. Как известно, ферментативное расщепление жира сопровождается подкислением реакционной среды за счет образования жирных кислот. Это позволило провести определение активности липазы методом компенсационной потенциометрии, используя титратор датской фирмы «Radiometer» TGT2 с автоматической buretкой ABU12 (Бенедиктов, 1975). Запись кинетики реакции фиксировалась на ленточном самописце SBR2. Постоянная величина pH 7.4 поддерживалась автоматически 0.003N раствором NaOH.

Лямбелии, отмытых от дрожжей описанным выше способом, отделяли от стенок флакона встряхиванием с холодным раствором Рингера, переносили в центрифужную пробирку и осаждали при 1500 об/мин в течение 10 мин. Осадок перемешивали с 1 мл раствора Рингера и переносили в реакционную камеру прибора, куда добавляли 6.5 мл 0.04%-го раствора трибутирина и 2 мл 0.1%-го раствора липазы. Реакцию проводили при температуре 37° при постоянном перемешивании. Скорость реакции выражали в нм MH^+ в 1 мин.

Степень торможения выражали в процентах по отношению к контрольной пробе, не содержащей лямблив. Для расчета брали среднюю скорость гидролиза за первые 5 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 1 приведены результаты опытов определения заключительных стадий гидролиза трибутирина. Каждая цифра в таблице является средним значением 2—3 флааконов. Из приведенной таблицы видно, что в различных опытах наблюдались колебания в количестве образовавшегося в ходе гидролиза глицерина. Однако во всех случаях количество глицерина в опытных флааконах было меньше, чем в контрольных. Сравнение средних значений образовавшегося глицерина в опытных и контрольных флааконах показывает, что разница между ними статистически достоверна ($t=4.5$, $p > 0.95$).

Т а б л и ц а 1

Определение заключительных стадий гидролиза трибутирина липазой в присутствии лямблив и без них
(колориметрический метод)

№№ опытов	Количество глицерина (мкг) за 15 мин инкубации	
	опыт	контроль
1	11.5	14.5
2	10.8	13.4
3	12.0	13.0
4	12.4	14.4
5	12.0	13.7
6	11.0	12.8
7	12.8	13.7
В среднем ($\bar{x} \pm s_x$)	12.0 ± 0.8	13.8 ± 0.8

Результаты зависимости гидролиза от количества лямблив во флааконах приведены в табл. 2. Каждая цифра в ней является средней из 5—8 флааконов.

Т а б л и ц а 2

Ферментативный гидролиз трибутирина в зависимости от количества лямблив

Число лямблив на стенке флаакона в одном поле зрения микроскопа (увел. 7×8)	Количество глицерина (мкг) за 15 мин инкубации		Степень достоверности (t) при сравнении с контролем
	x	s	
Отсутствуют (контроль)	16.0	0.4	
100—200	14.7	1.3	2.1
300—400	12.9	1.9	1.7
500—600	9.4	0.9	13.2

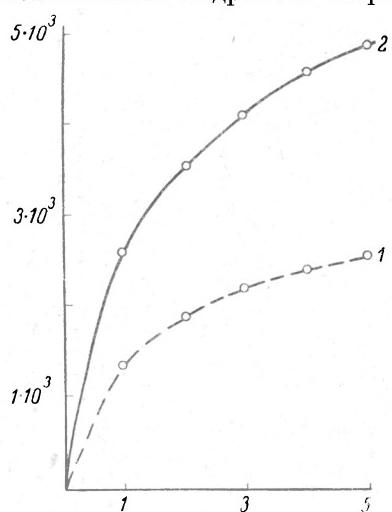
Из материала, представленного в таблице, видно, что количество образовавшегося глицерина было в обратной зависимости от количества лямблив. Оно было наиболее высоким во флааконах с минимальным количеством организмов (100—200 лямблив в поле зрения) и наиболее низким при максимальном числе их (500—600 в поле зрения).

С другой стороны, количество глицерина в опытных флааконах всегда было меньшим, чем в контрольных. Разница между контролем и опытом была, однако, статистически недостоверной в сериях с малым и умеренным количеством лямблив ($p < 0.95$), но становилась значимой ($t=13.2$, $p > 0.99$) при большом количестве лямблив во флааконах. Таким образом,

Таблица 3
Влияние лямблей на скорость гидролиза трибутирина липазой
(потенциометрический метод)

№№ опыта	Средняя скорость гидролиза в нм MNH_4^+ в мин		Процент торможения
	опыт	контроль	
1	330	564	41.0
2	280	564	49.5
3	433	600	29.0
4	434	672	36.5
5	473	740	36.0
6	524	743	38.0
7	544	813	33.0
В среднем	434 ± 0.08	677 ± 0.09	37.6 ± 2.4

полученные данные свидетельствуют о том, что степень замедления ферментативного гидролиза жира зависит от количества лямблей.



Скорость гидролиза трибутирина липазой в присутствии лямблей и в контроле.

По оси абсцисс — время гидролиза (в мин), по оси ординат — скорость гидролиза нм MNH_4^+ в 1 мин. 1 — гидролиз в присутствии лямблей, 2 — то же в контроле.

В присутствии лямблей промежуток времени угол наклона вычерчиваемой кривой меньше, чем в контрольных наблюдениях, что свидетельствует о замедлении скорости реакции с самого ее начала. Таким образом, тормозящее влияние лямблей сохраняется на протяжении всего времени гидролиза.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты настоящей работы, полученные двумя различными методами, однозначно указывают на то, что присутствие интактных лямблей в инкубационной смеси тормозит ферментативный гидролиз трибутирина липазой, что наблюдается на всем протяжении гидролиза, и степень торможения зависит от количества лямблей.

В опытах с гельминтами (Ruff, Read, 1973) в качестве одной из возможных причин тормозящего воздействия *Hymenolepis diminuta* на гидролиз жира липазой высказывалось предположение, что активные участки

фермента блокируются в результате адсорбции на поверхности гельминта. Наши данные не позволяют ни принять, ни отвергнуть эту гипотезу. Однако наряду с ней возможны предположения, что лямблии способны выделять субстанции, инактивирующие фермент, а также использовать субстрат или продукты реакции.

При анализе обнаруженного явления нам представляется целесообразным обратить внимание на то, что липаза, очевидно, является фактором, неблагоприятным для лямблей. В пользу этого говорят опыты (Roux, Ecalle, 1968), обнаружившие замедление роста культуры лямблей в присутствии этого фермента в среде. Поэтому не исключено, что обнаруженное нами снижение активности липазы свидетельствует о наличии у лямблей защитного механизма от ее неблагоприятного влияния.

Феномен подавления активности пищеварительных ферментов наблюдается не только у паразитов. Этим свойством обладает интактная человеческая слизистая оболочка кишечника (Borgstrom a. oth., 1957; Goldberg a. oth., 1969). По-видимому, это уникальный механизм защиты живых клеток от переваривания пищеварительными ферментами, так как в специальных исследованиях показано, что погибшие клетки утрачивают эту способность.

Полученные нами данные должны быть обсуждены и в связи с тем, что в клинических исследованиях неоднократно отмечалась стеаторея при инфекции лямбиями (Antia a. oth., 1966; Зальнова, Ишмухамедов, 1966; Morecki, Parker, 1967).

Однако ответить на вопрос о том, насколько полученные нами данные связаны с этим явлением, достаточно сложно. Асс (1963), а также Н. А. Дехкан-Ходжаева (1970) сообщили о понижении активности ферментов поджелудочной железы у больных, зараженных лямбиями. В то же время из работ, посвященных непосредственному изучению возможных причин развития стеатореи при лямблиозе, следует, что она зависит от нарушения всасывания продуктов гидролиза, а не от подавления ферментативной активности. Таким образом, вопрос о том, в какой степени подавление лямбиями ферментативного гидролиза жира отражается на процессах кишечного пищеварения, требует еще дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

1. Ферментативный гидролиз трибутирина липазой *in vitro* замедлялся в присутствии интактных лямблей *L. duodenalis*.
2. Тормозящее влияние лямблей наблюдалось на протяжении всего времени гидролиза и коррелировало с количеством паразитов.
3. Обнаруженное явление, возможно, отражает механизм защиты лямблей от переваривания липазой в кишечнике.

Л и т е р а т у р а

- Акимова Р. Ф., Соловьев М. М., Козюк П. М. 1974. Изучение влияния *Lamblia duodenalis* на ферментативный гидролиз крахмала *in vitro*. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 4 : 456—458.
- Асс И. Д. 1963. Влияние лямблиоза на гепато-билиарную и гастро-панкреатическую системы у детей и сравнительная оценка некоторых методов его лечения. Сб. дисс. работ сотрудников Украинского ин-та усовершенствования врачей, 3 : 83—89.
- Дехкан-Ходжаева Н. А. 1970. Лямблиоз. Патогенез, клиника, лечение. Ташкент.
- Зальнова Н. С., Ишмухамедов А. И. 1966. Стеаторея при лямблиозе. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 1 : 110.
- Соловьев М. М. 1967. Всасываемость липидов при экспериментальном лямблиозе. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 5 : 585—589.
- Соловьев М. М. 1968. Биология лямблей и взаимоотношения их с организмом хозяина (обзор литературы). Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 6 : 720—726.
- Соловьев М. М., Акимова Р. Ф., Шмакова В. И. 1971. Выделение и поддержание культур *Lamblia duodenalis* на модифицированной среде Карапетяна. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 1 : 75—78.

- У г о л е в А. М., И е з у и т о в а Н. Н., М а с е в и ч Ц. Г., Н а д и р о в а Г. Я.,
Т и м о ф е е в а Н. М. 1969. Исследование пищеварительного аппарата у че-
ловека. «Наука», Л.: 216.
- A n t i a F. P., D e s a i H. G., J e e j e e b h o y H. H., K a n e M. P., B o r-
k a r A. V. 1966. Giardiasis in adult. Incidence, symptomatology and absorp-
tion studies. Indian J. med. sci., 20 (7) : 471—477.
- B o r g s t ö m B., D a h l q v i s t A., L u n d h G., S j ö v a l l J. J. 1957. Studies
of intestinal digestion and absorption in the human. Clin. Invest. 36 : 1521—1536.
- H o l d b e r g D. M., C a m p b e l l R., R o y A. D. 1969. Studies on the binding
of trypsin and chymotrypsin by human intestinal mucosa. Scand. J. Gastroenterol.
4 : 217—226.
- M o r e c k i R., P a r k e r J. G. 1967. Ultrastructural studies of the human Giardia
lamblia and subjacent jejunal mucosa in a subject with steatorrhea. Gastroenterology
52 (2) : 151—164.
- M u e l l e r J. C., J o n e s A. L., B r a n d b o r g L. L. 1973. Scanning electron mi-
croscope observation in human giardiasis. Scann. Electron microsc. Chicago, III :
557—563.
- R o u x J., E c a l l e R. 1968. Influence du suc pancréatique sur la prolifération in
vitro du Giardia duodenalis. C. R. Acad., 266 (seric D) : 2434—2436.
- R u f f M. D., R e a d C. P. 1973. Inhibition of pancreatic lipase by Hymenolepis di-
minuta. Parásitol., 59 : 105—111.

STUDY OF FERMENTATIVE HYDROLYSIS OF FAT IN THE PRESENCE
OF LAMBLIA DUODENALIS (IN VITRO)

R. F. Akimova, I. I. Benediktov, M. M. Soloviev

S U M M A R Y

The influence of *Lamblia* on the hydrolysis of fat by lipase was studied in vitro. The hydrolysis rate of fat in the presence of live *Lamblia* and without them was determined colorimetrically by the quantity of the formed glycerine. In addition, the kinetics of this reaction was studied by the method of compensating potentiometry by neutralization of fat acids with alkali.

The intact organisms were found to cause an inhibition of fermentative hydrolysis of fat. The importance of this fact from the point of view of interaction in the host-parasite system is discussed.
